

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007 ～ 2009
 課題番号： 19390191
 研究課題名 (和文) ストレスに対する生体応答と疾患形成
 研究課題名 (英文) Host responses to stress and progression to disease

研究代表者

磯部 健一 (Ken-ichi Isoe)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：20151441

研究成果の概要 (和文)：

ストレス刺激による組織損傷に対し、生体の免疫系が作用し、損傷組織を貪食修復し、組織の再生へと向かう。組織破壊後、好中球、マクロファージが B 細胞の産生する自己抗体の助けを借りて創傷組織を貪食し、組織再生が進行する。ところが、ブレオマイシン、DSS といった活性酸素を産生するストレス刺激が持続的に存在すると、全身性強皮症、潰瘍性大腸炎、動脈硬化へと進行することを個体レベル (マウス)、細胞、分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Stresses destruct tissues and wound repair processes begin. In wound healing, phagocytes such as neutrophils and macrophages clear damaged tissues, pathophysiologic processes which are also observed in atherosclerosis and autoimmune diseases. This process requires that phagocytes recognize specific surface receptors. Phagocytosis is enhanced by autoantibody-mediated opsonization of damaged tissues. We showed that Bleomycin or DSS prolong the wound healing processes and progress to systemic sclerosis and ulcerative colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・ 内科学一般 (含心身医学)

キーワード：ストレス、マクロファージ、生体応答

1. 研究開始当初の背景

細胞のストレス応答に関する研究はシグナル伝達系、それに伴う遺伝子発現制御のすぐれた研究が多く、先端研究として発表されている。ところが、こうした研究成果を個体レベルで統合し、人の病気の発症、病態形成に結びつける研究はやっと端緒についたばかりで

ある。また従来、内科の領域で扱われたストレスという言葉はどちらかというと心理的ストレスの病気発症への関与であり、その科学的解明は今後の課題である。本研究では細胞にかかるストレスによって細胞はアポトーシスと呼ばれる細胞死と、ストレスによって産生される活性酸素が変異自己成分を産生する

ことに着目した。本研究では自己の死細胞、変異成分を免疫系が処理し、その過程で様々な病態形成に関与すること、その免疫系は神経系の支配を受けることから心理ストレスの病気への重要な関与を明らかにすることをめざした。

2. 研究の目的

私たちは様々なストレス性環境要因(放射線、紫外線、薬物等)が細胞を死に至らしめる時、細胞がどのように反応し、免疫系が変化した自己をどのように認識するかを解析している。私たちの仮説は以下である。ストレス性環境要因は細胞に多量の活性酸素を発生させ、この活性酸素が細胞死を導くとともに様々な細胞成分を酸化させる。マクロファージ系の細胞は死細胞を貪食し、非自己に変異した細胞成分をT細胞に提示する。自己あるいは変異自己に反応するT細胞はB細胞に作用し、自己抗体を産生させる。この反応は一過性であり、多くは自己免疫を制御するT細胞、樹状細胞の働きでもとに復帰する。この過程に遺伝的要因、持続感染といったアジュバント効果が加わると自己免疫疾患に発展する。活性酸素で変異した自己成分をマクロファージが認識することで、従来の自己免疫ばかりでなく、成人病として知られる多くの疾患の病態を形成すると考えられる。例えば、酸化LDLは動脈硬化を引き起こす。ここでは環境ストレスは免疫系に作用し、多くの疾患の引き金になったり、病態形成に関与するといった仮説の実証研究を行う。

3. 研究の方法

(1) ストレス刺激; 活性酸素を産生させるストレス刺激として、ブレオマイシンを皮下投与(4週連続)、DSSを腸管に飲み水とともに投与した(1週間連続)。

(2) マウス; 純系 C57BL/6, BALB/c マウス、ストレス応答遺伝子 GADD34 ノックアウトマウスを使用し、名古屋大学実験動物指針に従って研究を行った。

(3) ストレス刺激後マウス各臓器を採取し、組織切片をH&E染色、各種抗体による免疫染色、脾臓、胸腺、リンパ節は細胞浮遊液を作製し、蛍光色素のついた抗体で染色し、FACSで解析した。骨髓細胞を採取し、GM-CSFで7日間培養し、樹状細胞とした。

(4) 疾患の形成過程は組織損傷とそれに対する生体応答である。その解析の単純化をするため、マウス背部皮膚にパンチバイオプシーをし、その治癒過程で浸潤してくる免疫細胞、繊維芽細胞等を組織、FACSで解析し、遺伝子発現(RT-PCR)や自己抗体の産生をwestern blottingで検索した。

4. 研究成果

(1) 自己免疫疾患全身性強皮症のマウスモデル、シェーグレンモデルマウス

強皮症は全身性のものと皮膚に局限するものがあり、全身性強皮症は現在対症療法しか治療がなく、予後が不良である。これまで、ブレオマイシン皮下投与による皮膚限局性強皮症モデルマウスが東京医科歯科の皮膚科のグループ、米国のグループが報告して来た。私たちは活性酸素を産生するブレオマイシンを2ヶ月齢マウスに連続皮下投与すると、著しく病態がひとの全身性強皮症に似ているモデルマウスの作製に成功した。このモデルマウスはBALB/c, C3H マウスで、ブレオマイシン連続投与後、皮膚病変のみでなく、全身に病変がみられることが、組織染色で判明した。特に食道の病変は全身性強皮症に特徴的であり、食道平滑筋の萎縮、繊維芽細胞の増殖とコラーゲン繊維の増大が見られた。また、胃粘膜、腸粘膜のびらんもみられ、T細胞浸潤が見られたそのマウスの脾臓細胞を採取し、そのまま、あるいは磁気によりCD4T細胞のみを分離後、正常ヌードマウスに移入すると、皮膚病変、食道等強皮症の病変が再現できた。一方ブレオマイシンを生後3日以内のマウスに投与すると、唾液腺の破壊と、リンパ球浸潤がみられるシェーグレンモデルマウスが作製された。

(2) DSS投与マウスによる潰瘍性大腸炎と、胸腺萎縮

DSSは活性酸素を腸管で産生させ、腸管上皮の破壊にともなう潰瘍性大腸炎を発症する。ところが、このマウスの胸腺を検索すると、著しい胸腺萎縮が観察された。このマウスの胸腺萎縮は、ストレスにより産生されるステロイドによる可能性が判明した。

(3) 創傷治癒過程における免疫系の役割、マウス背部皮膚にパンチバイオプシーをし、組織を採取し、治癒過程を詳細に検討すると、まず好中球が浸潤し、つぎにマクロファージが浸潤してくる。その後、これらの細胞が死滅し、繊維芽細胞がコラーゲンを産生し、皮膚の再生に向かう。この過程でC57BL/6マウスの好中球を除去すると、再生が遅延した。この変化は老化マウスにより顕著に見られた。ただし、現在進行形の研究ではICR等他のマウス系統では好中球は創傷治癒を長引かせる方向に働く。すなわち、好中球は創傷時、損傷部位の掃除や菌の除去に有効であるが、同時に再生を遅延させる可能性が示唆された。創傷部位にはB細胞、T細胞はほとんど見られない。ところが、創傷組織は自己の抗体と反応し、抗体のオプソニン効果が好中球やマクロファージが自己組織を貪食するのを助けるこ

とが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 21 件)

1. Hida D, Ishiguro N, Haneda M, Ishida Y, Suzuki H, Isobe K. Intra-bone marrow bone marrow transplantation rejuvenates the B-cell lineage in aged mice. *Immunol Cell Biol.* 2010. 88(1):87-94. 査読有り
2. Nishio N, Ito S, Suzuki H, Isobe K. Antibodies to wounded tissue enhance cutaneous wound healing. *Immunology.* 2009 Nov;128(3):369-80. 査読有り
3. Sakurai H, Inami Y, Tamamura Y, Yoshikai T, Sehara-Fujisawa A, Isobe K. *Stem Cell Res.* 2009 Sep-Nov;3(2-3):157-69. 査読有り
4. Ogasawara N, Oguro T, Sakabe T, Matsushima M, Takikawa O, Isobe K, Nagase F. Hemoglobin induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells through the activation of PI3K, PKC, and NF- κ B and the generation of reactive oxygen species. *J Cell Biochem.* 2009 Oct 15;108(3):716-25. 査読有り
5. Matsumoto N, Okochi M, Matsushima M, Kato R, Takase T, Yoshida Y, Kawase M, Isobe K, Kawabe T, Honda H. Peptide array-based analysis of the specific IgE and IgG4 in cow's milk allergens and its use in allergy evaluation. *Peptides.* 2009 Oct;30(10):1840-7. 査読有り
6. Shi Z, Okuno Y, Rifa'i M, Endharti AT, Akane K, Isobe K, Suzuki H. Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *Eur J Immunol.* 2009 Aug;39(8):2106-19. 査読有り
7. 磯部健一、西尾尚美、伊藤佐知子、免疫機能低下と老化関連疾患, 日本臨床 2009 67(7), 1327-133. 査読無
8. Matsumoto N, Okochi M, Matsushima M, Ogawa A, Takase T, Yoshida Y, Kawase M, Isobe K, Kawabe T, Honda H. Development of peptide arrays for detection of IgE-binding epitopes in cow's milk allergens. *J Biosci Bioeng.* 2009 Mar;107(3):324-30. 査読有り
9. Ishikawa H, Ito S, Nishio N, Yuzawa Y, Matsuo S, Isobe K. Injection of bleomycin in newborn mice induces autoimmune sialitis that is transferred by CD4 T cells. *Immunol Cell Biol.* 2009 May-Jun;87(4):351-8. 査読有り
10. Ishikawa H, Takeda K, Okamoto A, Matsuo S, Isobe K. Induction of autoimmunity in a bleomycin-induced murine model of experimental systemic sclerosis: an important role for CD4+ T cells. *J Invest Dermatol.* 2009 Jul;129(7):1688-95. 査読有り
11. Miura H, Shirokawa T, Isobe K, Ozaki N. Shifting the balance of brain tryptophan metabolism elicited by isolation housing and systemic administration of lipopolysaccharide in mice. *Stress.* 2009;12(3):206-14. 査読有り
12. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 2008 Dec;57(12):1682-9. 査読有り
13. Yoshida N, Ino K, Ishida Y, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Terauchi M, Nawa A, Akimoto H, Takikawa O, Isobe K, Kikkawa F. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 15;14(22):7251-9. 査読有り
14. Suzuki H, Shi Z, Okuno Y, Isobe K. Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells? Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells? 2008, Nov;69(11):751-4. 査読有り
15. Rifa'i M, Shi Z, Zhang SY, Lee YH, Shiku H, Isobe K, Suzuki H. CD8+CD122+ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- α betaTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *Int Immunol.* 2008 Jul;20(7):937-47. 査読有り
16. Sakurai H, Okawa Y, Inami Y, Nishio N, Isobe K. Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells

contribute to muscle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. *Stem Cells*. 2008 Jul;26(7):1865-73. 査読有り

17. Nishio N, Okawa Y, Sakurai H, Isobe K. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. *Age (Dordr)*. 2008 Mar;30(1):11-9. 査読有り

18. Shi Z, Rifa'i M, Lee YH, Shiku H, Isobe K, Suzuki H. Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8+CD122+ regulatory T cells. *Immunology*. 2008 May;124(1):121-8. 査読有り

19. Hara T, Ogasawara N, Akimoto H, Takikawa O, Hiramatsu R, Kawabe T, Isobe K, Nagase F. High-affinity uptake of kynurenine and nitric oxide-mediated inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in bone marrow-derived myeloid dendritic cells. *Immunol Lett*. 2008 Feb 15;116(1):95-102. 査読有り

20. Hara T, Yamakura F, Takikawa O, Hiramatsu R, Kawabe T, Isobe K, Nagase F. Diazotization of kynurenine by acidified nitrite secreted from indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing myeloid dendritic cells. *J Immunol Methods*. 2008 Mar 20;332(1-2):162-9. 査読有り

21. Hiramatsu R, Hara T, Akimoto H, Takikawa O, Kawabe T, Isobe K, Nagase F. Cinnabarinic acid generated from 3-hydroxyanthranilic acid strongly induces apoptosis in thymocytes through the generation of reactive oxygen species and the induction of caspase. *J Cell Biochem*. 2008 Jan 1;103(1):42-53. 査読有り

[学会発表] (計 31 件)

1. Nishio N, Ito S, Suzuki H and Isobe K. Roles of B cells to wound healing. II 第 3 9 回日本免疫学会総会 2009年12月4日 大阪

2. Mohammad Nizam uddin, Nishio N, Ito S, Suzuki H and Isobe K. Immune status of the D-galactose treated aged mice. 第 3 9 回日本免疫学会総会 2009年12月4日 大阪

3. Endharti Agustna Tri, Okuno Y, Isobe K.

Suzuki H. CD8+CD122+ regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. 第 3 9 回日本免疫学会総会 2009年12月3日 大阪

4. Okuno Y, Endharti Agustna Tri, Isobe K, Suzuki H. Establishment of an easy assay system for human CD8+CXCR3+regulatory T cells. 第 3 9 回日本免疫学会総会 2009年12月3日 大阪

5. Mohammad Nizam uddin, Naomi Nishio, Sachiko Ito and Ken-ichi Isobe Thymic structural changes in immune aging by D-Galactose 第 3 2 回日本基礎老化学会 2009年6月20日 横浜

6. 西尾尚美、伊藤佐知子、磯部健一 創傷治癒における自己組織結合抗体の役割と年齢変化 第 3 2 回日本基礎老化学会 2009年6月20日 横浜

7. 磯部健一、樋田大輔、西尾尚美、伊藤佐知子 老化に伴う B 細胞発生、分化の変化 骨髄内骨髄移植による老化 B 細胞の若返りの可能性 II. 第 3 2 回日本基礎老化学会 2009年6月19日 横浜

8. 磯部健一 免疫系の老化と疾患、制御の可能性 (シンポジウム、免疫機能の制御) 第 9 回日本抗加齢学会 2009年5月28日 東京

9. H. Sakurai, Y. Inami, Y. Tamamura, K. Isobe. Bidirectional induction toward paraxial mesodermal derivatives from mouse ES cells in chemically defined medium 第 31 回日本分子生物学会, 2008年12月9日 神戸

10. Okuno Yusuke, Shi Zhe, Isobe Ken-ichi, Suzuki Haruhik. Analysis of the function of CD8+CD122+ regulatory T cells in tumor immunity 第 3 8 回日本免疫学会総会 2008年12月2日 京都

11. 樋田大輔, 羽根田正隆, 石田佳幸, 伊藤佐知子, Nizam uddin, 鈴木治彦, 磯部健一 骨髄内骨髄移植による老化 B 細胞の若返り 第 3 8 回日本免疫学会総会 2008年12月2日 京都

12. Ishikawa Hideaki, Ito Sachiko, Kenichi Isobe. Bleomycin induces autoimmune sialitis in new born mice. 第 3 8 回日本免疫学会総会 2008年12月1日 京都

13. Kobayashi Taku, Okamoto Susumu, Hisamatsu Tadakazu, Kamada Nobuhiko,

Chinenn Hiroshi, Kanai Takanori, Isobe Ken-ichi, Hibi Toshifumi. IL23 differentially regulates Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Croh's disease. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月1日京都

14.Naomi Nishio, Sachiko Ito and Ken-ichi Isobe. Wound healing is enhanced by autoantibodies generated in response to wounding. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月1日京都

15.Suzuki Haruhiko, Shi Zhe, Okuno Yusuke, Isobe Ken-ichi. Human CD8+CXCR3+ cells have the same function as murin CD8+CD122+ reguratory T cells. 第38回日本免疫学会総会 2008年12月1日京都

16.Hidetoshi Sakurai, Yuta Inami, Naomi Nishio, Tohru Yoshikai and Ken-ichi Isobe. Efficient induction of osteogenic and chondrogenic progenitors and myogenic progenitors from mouse ES cells in chemically defined medium. 2008 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science.。2008年10月8日。名古屋

17.石田佳幸、児崎達哉、磯村宣和、春光、張エイ、羽根田正隆、磯部健一黒質ドーパミン神経細胞の発火様式と線条体への投射系への加齢変化。第31回基礎老化学会。2008年6月13日、松本

18.田中千恵、西尾尚美、伊藤佐知子、磯部健一、粘膜損傷治癒における老化と好中球。第31回基礎老化学会。2008年6月13日、松本

19.樋田大輔、羽根田正隆、石田佳幸、磯部健一老化に伴うB細胞発生、分化の変化
骨髄内骨髄移植による老化B細胞の若返りの可能性。第31回基礎老化学会。2008年6月13日、松本

20.西尾尚美、田中千恵、伊藤佐知子、磯部健一自己反応性B細胞の創傷治癒における役割と年齢変化第31回基礎老化学会。2008年6月13日、松本

21.Haneda Masataka, isobe Ken-ichi. Bリンパ球活性化におけるプロテインフォスファターゼ1とGADD34の役割. 第37回日本免疫学会総会, 2007年11月20日, 東京

22.SHI Zhe, Rifai Muhaimin, LEE Yong Ho ,Isobe Ken-ichi、Suzuki Haruhiko。Deregulated activation of CD4+CD25- cells in the absence of CD8+CD122+ regulatory T cells despite the presence of CD4+CD25+ Treg in

vivo. 第37回日本免疫学会総会, 2007年11月20日, 東京

23.Suzuki Haruhiko, SHI Zhe, LEE Yong Ho, Isobe, ken-ichi, Rifai MuhaiminIsobe。Functional and chemical analysis of a monoclonal antibody that preferentially react with CD8+CD122+ regulatory T cells.。第37回日本免疫学会総会, 2007年11月20日, 東京

24.Suzuki Haruhiko, SHI Zhe, LEE Yong Ho, Isobe, ken-ichi, Rifai MuhaiminIsobe。CD8+CD122+制御性T細胞に優先的に反応するモノクローナル抗体の機能的ならびに化学的解析。第37回日本免疫学会総会, 2007年11月20日, 東京

25.石田佳幸,小林朋子、ニージャム、M.,吉田憲生、羽根田正隆、磯部健一骨髄および胎仔肝由来ミクログリアの神経損傷時の動態について。第37回日本免疫学会総会, 2007年11月20日, 東京

26.KIMURA Kenya,Ito Sachiko, Haneda Masataka , Isobe Ken-ichi。Phosphorylation of eIF2a was upregulated in BMDc by the stimulation with LPS. 第37回日本免疫学会総会, 2007年11月21日, 東京

27.Hideaki Ishikawa, Kozue Takeda, Masataka HANEDA, ISHIDA Yoshiyuki and Ken-ichi ISOBE. プレオマイシンによる全身性强皮症モデル第37回日本免疫学会総会, 2007年11月21日, 東京

28.Naomi Nishio, Hidetoshi Sakurai , ISHIDA Yoshiyuki, Haneda Masataka and Ken-ichi Isobe Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. 第37回日本免疫学会総会, 2007年11月21日, 東京

29.LEE Yong Ho, Suzuki Haruhiko, Isobe Ken-ichi T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. 第37回日本免疫学会総会, 2007年11月21日, 東京

30.SASAKI Makoto, Masataka HANEDA, ISHIDA Yoshiyuki , ISOBE Ken-ichi. Thymus involution by oral administration of DSS. 第37回日本免疫学会総会, 2007年11月22日, 東京

31.Lee Yongho, Isobe Kenichi, Suzuki Haruhiko Role of CD8+CD122+regulatory T

cells in experimental autoimmune encepharomyelitis(II) 第37回日本免疫学会総会, 2007年11月22日, 東京

〔図書〕(計2件)

磯部 健一, 免疫系の加齢変化 (新老年学) 2010, 169-184.

H. Sakurai, Y. Inami, N.Nishio, S. Ito, T. Yoshikai, H. Suzuki and K.Isobe Specific serum-free conditions can differentiate mouse embryonic stem cells into osteochondrogenic and myogenic progenitors. 2010, 107-112

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: ヒト全身性強皮症動物モデルの作製方法、ヒト全身性強皮症動物モデル及びその用途

発明者: 磯部健一石川英昭

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2007-275484

出願年月日: 2007年10月23日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯部 健一 (Ken-ichi Isobe)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20151441